



**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E MUDANÇA DO CLIMA
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA**

Via Epia, BR 450, KM 8,5, Parque Nacional de Brasília, - Bairro PNB - Brasília - CEP
70635-800. Telefone: (61)2028-9097

**PLANO DE TRABALHO – PIBIC/ICMBIO
19º EDITAL DE SELEÇÃO – CICLO 2024/2025**



Título do Plano de Trabalho:

Protocolo de obtenção de amostras de qualidade e prioridades para levantamentos de dados genéticos de abelhas desenvolvidos através de um experimento com abelhas do Cerrado

Grande Área do Conhecimento		
<input type="checkbox"/> Ciências Exatas e da Terra	<input type="checkbox"/> Ciências da Saúde	<input type="checkbox"/> Ciências Humanas
<input checked="" type="checkbox"/> Ciências Biológicas	<input type="checkbox"/> Ciências Agrárias	<input type="checkbox"/> Linguística, Letras e Artes
<input type="checkbox"/> Engenharias	<input type="checkbox"/> Ciências Sociais Aplicadas	<input type="checkbox"/> Outras áreas

Orientador: Onildo João Marini Filho
Unidade do orientador: CBC
Coorientador: Antonio José Camilo Aguiar e Hannah Cascelli Farinasso
Instituição do coorientador: Universidade de Brasília – UnB e CBC/ICMBio
Estudante: Juliane Yurika Alves Sato
Instituição do Estudante (Cidade/UF): Universidade de Brasília - UnB (Brasília/DF)
Curso de graduação e semestre atual do estudante: Ciências Biológicas – 2º período

Escolha do(s)eixo(s):	Eixos temáticos prioritários de pesquisa - Conforme anexo I do 19º Edital PIBIC - 2024 /2025 <i>A tabela disponível no modelo do SEI foi totalmente atualizada e deve ser substituída por esta.</i>
	1 - Sociobiodiversidade, serviços ecossistêmicos e patrimônio espeleológico
X	2/3 - Gestão da informação sobre a biodiversidade para subsidiar o planejamento das ações de conservação
	4 - Planejamento e implementação da gestão nas unidades de conservação
	5 - Expansão e conectividade das áreas protegidas
	6 - Avaliação de impacto e licenciamento ambiental
	7 - Gestão pesqueira e cadeias produtivas em unidades de conservação de uso sustentável
	8 - Uso da fauna em unidades de conservação
	9 - Uso de produtos da sociobiodiversidade em unidades de conservação
	10 - Gestão e monitoramento participativos
	11 - Inteligência e efetividade na fiscalização e proteção da biodiversidade
	12 - Manejo de espécies exóticas invasoras
	13 - Restauração de habitats terrestres e aquáticos
X	14 - Conservação de espécies ameaçadas
	15 - Manejo integrado do fogo

1 - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um conjunto de ações prioritárias para levantamento de dados genéticos de espécies ameaçadas é de fundamental importância para potencializar ações de conservação abordando questões como estabilidade taxonômica das espécies alvo dos planos de conservação, variações genômicas entre populações das espécies e reconstrução de relações filogenéticas (Gill et al. 2016; Ferrari et al. 2023). Há cerca de 2 mil espécies de abelhas no Brasil, representando este um grupo de alta diversidade biológica. Além disso, em termos de abundância e representatividade é um grupo muito significativo, pois estão presentes em todos os biomas terrestres (Michener 2000). As abelhas são importantes agentes polinizadores, contribuindo nos setores alimentícios, medicinais, culturais e na própria manutenção de ecossistemas (Khalifa et al. 2021), entretanto estudos apontam que abelhas estão sofrendo um declínio global (Zattara e Aizen, 2021); No Brasil, o Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade (SALVE), coordenado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), registrou 137 espécies de abelhas no Cerrado, bioma este considerado uma das savanas mais biodiversas do mundo, mas que vem sendo desmatado progressivamente (Luiz e Steinke, 2022) e a escassez de estudos genéticos sobre as abelhas do cerrado é uma questão relevante.

No presente estudo pretendemos levantar um conjunto de princípios operacionais para guiar as decisões de seleção de espécies para coleta de dados genéticos. Serão consideradas questões relacionadas ao manejo das espécies para uso, seu grau de ameaça, distribuição geográfica e segurança de determinação taxonômica. Esse protocolo de ações será feito com a prática concomitante de uma avaliação da qualidade dos espécimes de abelhas sem ferrão mantidas em diferentes formas de conservação do material que podem influenciar o sucesso de obtenção do mitogenoma de cada amostra.

Um exemplo de incerteza taxonômica envolve espécies parapátricas ou simpátricas com mesmo ancestral direto. Dentro do processo de especiação é esperado comumente que espécies irmãs não compartilhem a mesma área de distribuição, logo espécies simpátricas ou parapátricas envolvem maior incerteza taxonômica.

O protocolo a ser desenvolvido envolve especialmente a parte prática que será a seleção de espécimes na coleção entomológica da UnB segundo os critérios como idade do material e método de conservação. O desenvolvimento do protocolo envolverá a extração de pernas do espécime, fotodocumentação, inserção dos dados em uma planilha e organização do banco de dados. A coleção entomológica da UnB conta com um acervo com centenas de espécies de abelhas sem ferrão e solitárias do Cerrado, Caatinga, Amazônia, Pampa e Mata Atlântica. A coleção está cadastrada no sistema SpeciesLink e no GBIF de modo que será possível fazer o tombamento das imagens relacionadas às sequências do mitogenoma facilmente por uma planilha nos moldes Darwin-core. Estimamos obter ao menos 25 espécies para sequenciamento de mitogenoma (vide Tabela 1).

O objeto deste trabalho não é em si o desenvolvimento de um protocolo de laboratório, uma vez que estes já existem, e sim o desenvolvimento de critérios de seleção de espécies ou populações

ameaçadas. Como exemplo, avaliaremos se uma determinada espécie tem uma população sob pressão antrópica e com distribuição ampla, mas com limite norte nesta região sob pressão. A população desta espécie nesta região receberia um ranqueamento de prioridade de estudo mais alto de sua genética de forma a gerar uma compreensão comparável com a população mais central para avaliar possíveis variações genéticas. Esta priorização é especialmente relevante para as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini onde há potencial econômico e perda de variedades (subespécies) com potencial diferencial de manejo.

O protocolo obtido ao final do trabalho proposto visa ajudar na obtenção de material genético de qualidade, na melhoria da biblioteca de referência de sequências de DNA mitocondrial, tão necessárias para o desenvolvimento de métodos de amostragem em campo para detecção destas espécies em amostras de DNA ambiental (e-DNA), esquemas de monitoramento da biodiversidade de abelhas, definição taxonômica e filogenia das espécies e pesquisas que envolvam DNA mitocondrial. As informações geradas no presente projeto propiciarão a melhor tomada de decisões entre curadores de coleções biológicas, pesquisadores e conservacionistas interessados em implementar ações que dependem de informações qualificadas de DNA mitocondrial das abelhas. Desta forma o processo de revisão e organização do protocolo apresentado neste projeto visa atender à seleção prioritária de espécies de abelhas ameaçadas ou manejadas em um universo de quase 2 mil espécies existentes no Brasil.

2 - OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS DO PLANO DE TRABALHO

Este estudo tem o objetivo geral desenvolver um protocolo para seleção de espécimes de abelhas, como foco inicial nas espécies da tribo Meliponini que ocorrem no Cerrado, com fins de estudo genético para conservação baseado na qualidade do material preservado em coleções biológicas. A partir da categorização gerada, será realizada a extração de DNA e o sequenciamento de mitogenomas de um conjunto de espécies selecionadas.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a qualidade e quantidade do DNA obtido de espécimes preservados em diferentes métodos em coleções biológicas: espécimes secos alfinetados, espécimes mantidos em álcool 70% e espécimes mantidos em álcool absoluto (99,7°);
- Desenvolvimento de um protocolo de ação para seleção de espécimes de qualidade para levantamento de dados genéticos;
- Geração e avaliação de sequências de mitogenoma comparando espécies próximas e distantes filogeneticamente com foco especial nas abelhas sem ferrão da tribo Meliponini;
- Melhoria do banco de dados genéticos de espécies de abelhas nativas brasileiras com mitogenoma disponível;
- Análise do banco de sequências para indicação das espécies deficientes de informações de mitogenomas.

3 – METODOLOGIA

As amostras de abelhas sem ferrão serão provenientes Coleção Entomológica da Universidade de Brasília (UnB) e de amostras da Coleção Zoológica do CBC. Serão obtidas informações do estado de ameaça das espécies, definidas a partir dos critérios estabelecidos pela IUCN, e sugestões apresentadas por outros autores sobre possíveis características de espécies de abelhas ameaçadas de extinção. Serão analisadas, ainda, a classificação de espécies de Meliponini do Cerrado prioritárias para levantamento de dados de mitogenoma. A Tabela 1 mostra uma lista preliminar das espécies focais a serem estudadas e algumas de suas características mais importantes para avaliação do seu estado de conservação. Serão usados os dados já disponibilizados pelo Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE (ICMBio 2024) e será realizada a revisão da literatura especializada. Posteriormente incluiremos informações sobre sua extensão de ocorrência e análises sobre a filogeografia das espécies: alopátrica, parapátrica ou simpátrica.

As amostras de DNA extraído passarão por uma avaliação em relação à quantidade e qualidade do DNA antes de serem enviadas para sequenciamento no Instituto Tecnológico da Vale (ITV). Estas serão checadas com espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Também será realizada análise das amostras em gel de agarose 1,5%. Essas análises serão feitas em colaboração com o Laboratório de Ecologia Molecular e Genética da Conservação da Universidade de Brasília. Após essa avaliação as amostras que tiverem quantidade e qualidade adequadas serão enviadas ao ITV para sequenciamento dos mitogenomas. Este será realizado com a utilização da Plataforma Illumina NextSeq2000.

A qualidade e as características de cada sequência de mitogenoma gerada será avaliada por métodos computacionais. Os mitogenomas sequenciados serão montados fazendo uso de um pipeline de bioinformática e analisados quanto à sua estrutura, número de pares de bases e integridade da sequência barcode. O tamanho da sequência do mitogenoma está entre as características mais importantes para sua utilização nos projetos que utilizarão essas informações. Posteriormente, será realizada uma análise comparativa entre os mitogenomas de abelhas obtidos nesse trabalho. Ao final, os mitogenomas serão depositados no GenBank para disponibilização destes dados para uso amplo.

Tabela 1. Lista preliminar de espécies de abelhas nativas que serão utilizadas no processo de extração do DNA e sequenciamento do mitogenoma. Outras espécies poderão ser adicionadas à medida em que possam ser obtidos exemplares para pesquisa.

Espécie	Distri- buição	Nidifica- ção	Manejá- vel ou não	Status de conser- vação	Taxonomia	Priorização de levantamento de mitogenoma
<i>Paratrigona incerta</i>	super restrita	solo	não	VU-MG	incerta	alta
<i>Melipona</i>	ampla	occos de	sim	EN	incerta	média

<i>rufiventris</i>		árvore				
<i>Melipona quinquefasciata</i>	ampla	solo	não	VU-SP	incerta	alta
<i>Plebeia droryana</i>	ampla	ocos de árvores	sim	LC	incerta	média
<i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i>	ampla	ocos	sim	LC	incerta	média
<i>Melipona quadrifasciata anthodiocetes</i>	ampla	ocos de árvores	sim	LC	incerta	média
<i>Melipona flavolineata</i>	ampla	ocos de árvores	sim	LC	incerta	média
<i>Schwarziana mourei</i>	restrita	solo	não	LC	certa	média
<i>Schwarziana chapadensis</i>	restrita	solo	não	LC	certa	média
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	ampla	solo	não	LC	certa	média
<i>Cephalotrigona capitata</i>	ampla	ocos de árvores	sim	CR-SP	incerta	alta
<i>Lestrimelitta rufipes</i>	ampla	ocos de árvores	não	LC	certa	média
<i>Lestrimelitta limao</i>	ampla	ocos de árvores	não	LC	certa	média
<i>Frieseomelitta varia</i>	ampla	ocos de árvores	sim	Não avaliada	incerta	alta
<i>Tetragona clavipes</i>	ampla	ocos de árvores	sim	LC	incerta	média
<i>Trigona spinipes</i>	ampla	externos	não	LC	incerta	média
<i>Trigona hyalinata</i>	ampla	externos	não	LC	incerta	média
<i>Trigona pallens</i>	ampla	solo	não	LC	certa	baixa
<i>Trigona recursa</i>	ampla	solo	não	LC	incerta	média
<i>Geotrigona subterranea</i>	ampla	solo	sim	LC	certa	baixa

<i>Geotrigona mombuca</i>	ampla	solo	sim	LC	certa	baixa
<i>Paratrigona lineata</i>	ampla	solo	não	LC	incerta	média
<i>Partamona combinata</i>	ampla	ocos de árvore	não	LC	certa	baixa
<i>Partamona cupira</i>	ampla	ocos de árvore	não	LC	certa	baixa
<i>Tetragonisca angustula</i>	ampla	ocos de árvore	sim	LC	incerta	média

4 - RESULTADOS ESPERADOS

A partir deste estudo espera-se:

- Avaliar a quantidade e a qualidade do DNA mitocondrial obtido comparando diferentes modos de conservação das amostras de material entomológico.
- Gerar um protocolo de priorização de levantamento genético de espécies de abelhas ameaçadas e não ameaçadas, manejadas ou não;
- Gerar mitogenomas de um conjunto significativo de espécies nativas;

5 - IMPORTÂNCIA DA EXECUÇÃO DA PESQUISA PARA A CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

Os resultados desse estudo serão utilizados como subsídios para a avaliação do estado de conservação e ações de conservação das espécies de abelhas nativas brasileiras, provendo uma melhoria substancial na biblioteca de sequências de DNA mitocondrial existente. Isto possibilitará o delineamento de esquemas de monitoramento genético das espécies, bem como apoio para decisão em ações de manejo e em outras áreas de pesquisa científica.

6 - ETAPAS E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PLANO DE TRABALHO

Etapa 1 – Revisão bibliográfica, levantamento do material disponível para material estudo focal das abelhas nativas.

Etapa 2 – Revisão da literatura, e desenvolvimento das práticas de seleção e curadoria do material entomológico para levantamento de dados genéticos.

Etapa 3 – Extração das pernas, montagem do banco de dados e avaliação da qualidade do DNA

Etapa 4 – Elaboração do relatório parcial de estágio PIBIC

Etapa 4 – Encaminhamento das amostras para sequenciamento no ITV, montagem e análise dos mitogenomas

Etapa 5 – Redação do relatório final do estágio PIBIC.

Etapa	Set/24	Out/24	Nov/24	Dez/24	Jan/25	Fev/25	Mar/25	Abr/25	Mai/25	Jun/25	Jul/25	Ago/25
1	X	X	X	X								
2	X	X	X	X								
3			X	X	X	X						
4						X						
5							X	X	X			
6								X	X	X	X	X

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferrari, G., Esselens, L., Hart, M. L., Janssens, S., Kidner, C., Mascarello, M., ... & Hollingsworth, P. M. (2023). Developing the Protocol Infrastructure for DNA Sequencing Natural History Collections. *Biodiversity Data Journal*, 11.
- Gill, R. J., Baldock, K. C., Brown, M. J., Cresswell, J. E., Dicks, L. V., Fountain, M. T., ... & Potts, S. G. (2016). Protecting an ecosystem service: approaches to understanding and mitigating threats to wild insect pollinators. In *Advances in ecological research* (Vol. 54, pp. 135-206). Academic Press.
- ICMBio (2024). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>. Acesso em: 01 de set. de 2024.
- Luiz, C. H. P.; Steinke, V. A. (2022). Recent environmental legislation in Brazil and the impact on Cerrado deforestation rates. *Sustainability*, v. 14, n. 13, p. 8096.
- Mayer, C., Dietz, L., Call, E., Kukowka, S., Martin, S., & Espeland, M. (2021). Adding leaves to the Lepidoptera tree: capturing hundreds of nuclear genes from old museum specimens. *Systematic Entomology*, 46(3), 649-671.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the World*. John Hopkins University Press. 872 p. ISBN: 978-0801861338.
- Timmermans, M. J., Viberg, C., Martin, G., Hopkins, K., & Vogler, A. P. (2016). Rapid assembly of taxonomically validated mitochondrial genomes from historical insect collections. *Biological journal of the Linnean Society*, 117(1), 83-95.
- Zattara, E. E.; Aizen, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One earth* (Cambridge, Mass.), v. 4, n. 1, p. 114–123, 2021

8 – AJUSTES E COMPLEMENTAÇÕES PARA SANAR AS RESSALVAS

1 - DE MANEIRA GERAL, OS TRABALHOS QUE PRETENDEM ORGANIZAR PROCEDIMENTOS EM EXPERIMENTOS GENÉTICOS SÃO MUITO NECESSÁRIOS, CONTUDO, DIZEM RESPEITO A UM UNIVERSO PEQUENO DE APLICABILIDADE, ONDE, NA MAIORIA DOS CASOS, OS PROTOCOLOS NECESSITAM SER ADAPTADOS PARA OUTRAS REALIDADES, COMO TIPO DE ORGANISMO,

OBJETIVO DA AMOSTRAGEM, QUANTIDADE DE MATERIAL GENÉTICO DO ORGANISMO A SER TRABALHADO, ANIMAIS PROVENIENTES DE COLETAS OU DE COLEÇÕES ENTOMOLÓGICAS, ENTRE OUTRAS.

Resposta: Quanto à questão do pequeno universo de aplicação apontado pelo revisor, o grupo em questão que são as abelhas representam cerca de 2 mil espécies no Brasil, e desta forma não é um grupo ou universo tão reduzido como apontado. Além disso, em termos de abundância e representatividade é um grupo muito significativo. Desta forma o processo de revisão e organização deste protocolo/fluxograma do projeto visa atender a seleção prioritária de espécies de abelhas ameaçadas ou sob risco de um universo de quase 2 mil espécies.

2 - ESTE PROJETO PROPÕE O TESTE DE UM PROTOCOLO, JÁ SENDO APLICADO PARA OBTENÇÃO DE ANÁLISES DE CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES DE ABELHA. ESTE FATO COMPROMETE O PROJETO UMA VEZ QUE O PROTOCOLO A SER PROPOSTO AINDA NÃO FOI VALIDADO, SENDO COMUM ALGUMA ALTERAÇÃO DURANTE AS DIVERSAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES, COMO COLOCADO NO ÚLTIMO PARAGRAFO DA INTRODUÇÃO.

Resposta: O teste do protocolo de análise do processo de extração do DNA a partir de material seco era uma questão que já foi revista e está sendo eliminada do projeto. O que será feito é uma seleção de critérios e prioridades na seleção de espécies potencialmente ameaçadas ou que estejam sob manejo, especialmente se tratando das espécies de interesse comercial como as abelhas sem ferrão do grupo Meliponini.

3 - TENDO EM VISTA SER UM GRUPO BEM ESTUDADO, PROVAVELMENTE JÁ DEVA EXISTIR UM PROTOCOLO LABORATORIAL ROBUSTO DISPONIVEL NA LITERATURA. SERIA INTERESSANTE QUE O PRESETE PROJETO ABORDASSE ESSA QUESTÃO, PROPODO NECESSIDADES ALTERAÇÕES PARA APLICAÇÃO NA REALIDADE LOCAL.

Resposta: O objeto em si não é um protocolo de laboratório e sim um protocolo de seleção de espécies ou populações criticamente ameaçadas, como por exemplo se uma determinada espécie tem uma população sob enorme pressão antrópica e com distribuição ampla mas com limite norte nesta região sob pressão, a população desta espécie nesta região receberia um ranqueamento de prioridade de estudo da sua genética através do mitogenoma e compreensão comparável com a população mais central para comparar possíveis variações genéticas. Esta priorização é especialmente relevante para as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini onde há potencial econômico e perda de variedades (subespécies) com potencial diferencial de manejo.

3 - FALTA NA INTODUÇÃO A EXPLICITAÇÃO DA PROBLEMÁTICA A SER ABORDADA. AS ABELHAS ESTÃO EM RISCO DE EXTINÇÃO? JÁ SÃO CONHECIDAS AS ESPÉCIES QUE HABITAM ESTA DETERMINADA ÁREA? JÁ HOVE ESTUDOS MOLECULARES NA REGIÃO?

Resposta: Já foi feito por duas vezes ciclos de avaliação de ameaças para abelhas pelo ICMBio, e há já um conjunto grande de espécies avaliadas quanto o risco de extinção. Será objeto do projeto abordar as espécies que já foram avaliadas e estão listadas no sistema SALVE do SISBIO, e a partir dos critérios e características ali apresentados, será construído este sistema de referência para avaliação de prioridades para estudo genético. Será foco as espécies do

Cerrado e o número de estudos genéticos já publicados é muito pequeno e de pouca relevância até o momento.

4 - COMO SUGESTÃO, INDICO A PADRONIZAÇÃO DO TERMO "PROTOCOLO" AO INVES DE "FLUXOGRAMA".

Resposta: Ok, será implementado só um termo no projeto e no processo.

5- A METODOLOGIA ADOTADA ESTÁ CARENTE DE INFORMAÇÕES.EXISTE UM RECORTE GEOGRÁFICO ESPECÍFICO OU SERÁ DE ABRANGENCIA NACIONAL? EXISTE UM RECORTE TAXONÔMICO DAS ESPÉCIES ANALISADAS?

Resposta: Sim, o recorte geográfico e taxonômico será sobre as abelhas do Cerrado e sobre os Meliponini.

6 - UM PONTO NEGATIVO DO PROJETO É QUE O OBJETIVO ESTÁ REFLETIDO PARCIALMENTE NA METODOLOGIA. O OBJETIVO GERAL É "AVALIAR A QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO E DAS SEQUENCIAS DE MITOGENOMA A PARTIR DE ESPÉCIES E ESPÉCIEMS DISTINTOS DE ABELHAS SEM FERRÃO DEPOSITADAS EM COLEÇÃO..." POR SUA VEZ A METODOLGIA ABORDA MUITOS PASSOS ALÉM DA MENSURAÇÃO DA QUANTIDADE DE MATERIAL GENÉTICO EXTRAÍDO. COM ISSO, O TRABALHA CIENTÍFICO SE MESCLA COM UM TRABALHO TÉCNICO DE CONSERVAÇÃO, DIFICULTANDO O ENTENDIMENTO, BEM COMO A OBTENÇÃO DOS RESULTADOS PROPOSTOS.

Resposta: Será ajustado o projeto para abordar somente a questão da seleção de espécies para o estudo genético com foco na conservação, e para isso será feito uma abordagem de caracterização de prioridades.